

**Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmungen
in Rattenhirnhomogenaten
und in Mitochondrien-Fractionen
von Ratten- und Schweinehirnen,
sowie Untersuchungen
über die Wirkung von Steroidhormonen
auf die Enzymaktivität**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

FRANK SCHRODER
aus Perleberg/Brandenburg

Marburg 1973

**Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmungen
in Rattenhirnhomogenaten
und in Mitochondrien-Fraktionen
von Ratten- und Schweinehirnen,
sowie Untersuchungen
über die Wirkung von Steroidhormonen
auf die Enzymaktivität**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

FRANK SCHRODER
aus Perleberg/Brandenburg

Marburg 1973



Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 5. Juni 1973
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. H. Oepen
Correferent: Prof. Dr. W. Wesemann

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	7
1. Biochemische Grundlagen der Arbeit	7
2. Aufgabe und Fragestellung	8
II. <u>Methode</u>	9
1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials	9
a. Das Rattenhirnhomogenat	9
b. Mitochondriensedimente	9
Aufnahmen von Mitochondrien	
2. Vorbereitung des Untersuchungsmaterials	
für die Enzymbestimmung	11
Biuretmethode	12
3. Beschreibung der Enzym-Bestimmungs-Methode	13
4. Übersichtsdarstellung der Methode	15
5. Verwendete Geräte, Puffer und Chemikalien	16
III. <u>1. Teil der Untersuchungen über die MAO-Aktivität:</u>	
A. <u>Arbeitsbedingungen</u>	19
B. <u>Vorversuche</u>	19
C. <u>Methodische Versuche und Resultate</u>	20
Versuch Nr.1	
Vergleich der verschiedenen Leerwerte	20
Versuch Nr.2	
Aufzeichnung der Aldehyd-Semikarbazon-	
Spektren von vier verschiedenen Aminen	22

Versuch Nr.3

Der Einfluß der Aminkonzentration auf die
Extinktion des Aldehyd-Semikarbazon 24

Versuch Nr.4

Der Einfluß der Proteinkonzentration auf
die Monoaminoxydase-Aktivität bei konstanter
Amingabe von 3 mikro Mol Tyramin / 0,2 ml
Mitochondriensediment 25

Versuch Nr.5

Beispiel eines Versuches zur Hemmung der
Enzymaktivität in vitro mit Hilfe der
untersuchten Methode 26

2. Teil der Untersuchungen 29

Über die Wirkung von Steroidhormonen auf die
Monoaminoxydase-Aktivität 29

1. Gewinnung der Schweinehirnmitochondrien-
fraktion 29

2. Untersuchungen über die Wirkung von Steroid-
hormonen auf die Monoaminoxydase-Aktivität
der Mitochondrienfraktion des Schweine-
hirns: 31

- a) Dehydroepiandrosteron 32
- b) Progesteron 33
- c) Cortison 34
- d) Ätiocholanolon 35

IV. Diskussion 37

V. Zusammenfassung 40

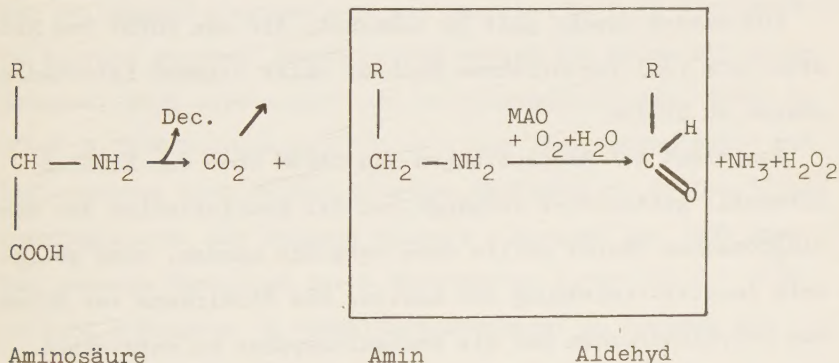
VI. Literaturverzeichnis 42

I. Einleitung

1. Biochemische Grundlagen der Arbeit

Aminooxydasen oxydieren die aus den Aminosäuren durch Decarboxylierung entstandenen Amine zu Aldehyden (35). Die Monoaminoxidase baut Amine durch oxydative Desaminierung mit nur einer endständigen NH_2 -Gruppe ab (7).

Abb. 1:



Die oxydative Desaminierung der Amine wurde erstmals von EWINS und LAIDLAW (1910) sowie von GUGGENHEIM und LÖFFLER (1916) beobachtet (24).

Monoamine abbauende Enzyme befinden sich in allen Geweben des menschlichen Körpers, speziell in den Zellorganellen, Mitochondrien und Mikrosomen (15). Über ihre prosthetische Gruppe ist nichts Sicheres bekannt.

2. Aufgabe und Fragestellung

Nachdem man sich zur Bestimmung der Monoaminoxydase zuerst histochemischer Färbetechniken (12) bedient hatte, wurde später ihre Aktivität auf dem Umweg über den Sauerstoffverbrauch, welcher zur oxydativen Desaminierung der Amine erforderlich ist, mit Hilfe der Warburg-Technik (16) gemessen. Die weitere Entwicklung der Monoaminoxydase-Aktivitätsbestimmung führte schließlich zu den heute üblichen Methoden (36), bei denen der von einer Enzymkatalyse abhängige Substratabbau (9, 11) gemessen wird.

Für unsere Zwecke galt es zunächst, die von POPOV und Mitarbeitern (34) beschriebene Methode unter eigenen Laborbedingungen zu prüfen.

Basierend auf Beobachtungen von OEPEN über den Einfluß hormonell gesteuerter Vorgänge bei der Manifestation der Huntingtonschen Chorea sollte dann versucht werden, eine geeignete in-vitro-Anordnung zur Analyse des Einwirkens vor allem von Steroidhormonen auf die Monoaminoxydase zu entwickeln.

II. Methode

1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

a. Das Rattenhirnhomogenat

Jeweils 6 männliche Ratten mit einem Gewicht von 150-200 g, durch Inzucht vom Stamm Wistar II erhalten, wurden ohne Betäubung durch Brechen der Halswirbel getötet und das Gesamthirn dem Schädel entnommen. Hirnhäute und Gefäße wurden weitgehend abpräpariert und das Hirn in 0,32 M eisgekühlte Sucrose gegeben. Anschließend wurden die Hirne mit einem Skalpell grob zerkleinert und nacheinander je zwei Hirne in 10 ml 0,32 M Sucrose bei 0°C in einem Glashomogenisator mit Teflonkolben nach Potter-Elvehjem (Kolbenspiel 0,25-0,32 mm) homogenisiert. Der Vorgang dauerte 2 Minuten bei 1000 upm. Das gesamte Homogenat der 6 Rattenhirne wurde bei 0 - +4°C in 0,32 M Sucrose im Verhältnis Homogenat zu Sucrose wie 1:3 zwei Stunden aufbewahrt.

b. Mitochondriensedimente

Die Mitochondriensedimente wurden nach der Methode von WESEMANN (1969) isoliert. Bei diesem Verfahren werden die Synaptosomen, die mit der rohen Mitochondrienfraktion anfallen, durch osmotischen Schock aufgebrochen und mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation von der Mitochondrienfraktion

getrennt. Da bei diesem Verfahren primär die Isolierung der Membranen erreicht werden soll, liegt die Mitochondrienfraktion (14) als Abfallprodukt (8,25) vor. Das Sediment wurde in 0,32 M Sucrose im Verhältnis Sediment zur Sucrose wie 1:3 bei 0 - +4°C zwei Stunden aufbewahrt.

Abb. 2: Schema eines Mitochondriums (nach A.THIEL (1959)) mit den Cristae mitochondriales als Sitz der Enzyme.

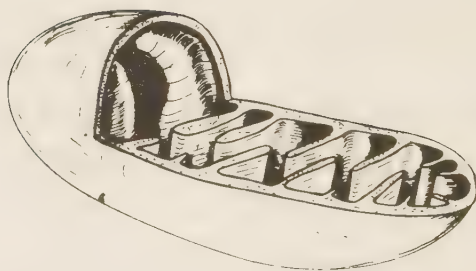
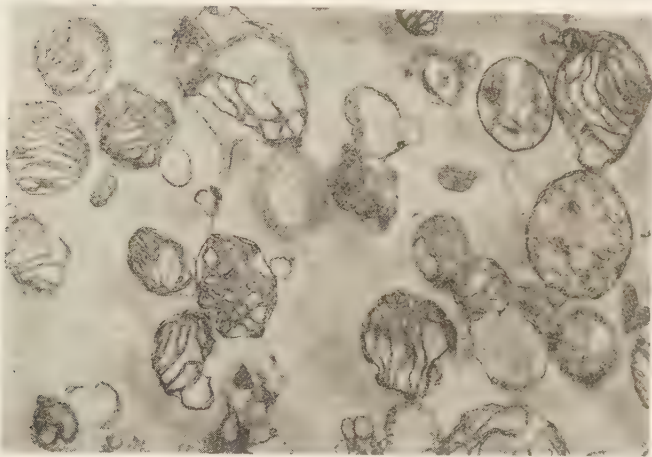


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Mitochondrien (10 000 x, Nachvergrößerung 2 x) im osmotischen Schockzustand, hervorgerufen durch Zugabe von Aqua bidest. (nach *maxX, mbg.*)



2. Vorbereitung des gewonnenen Untersuchungsmaterials für die Enzymbestimmung

Die bei 0 bis +4° zwei Stunden aufbewahrten unter Nr. 1 beschriebenen Hirnhomogenate und die Mitochondriensedimente wurden mit einem Elektro-Schüttelgerät ca. 3 Minuten resuspendiert. Anschließend wurde die Protein-Konzentration mit Hilfe der Biuret-Methode bestimmt.

Beschreibung der Biuret-Methode:

Prinzip: Die Eiweiß-Peptidbindungen bilden in der Biuret-Reagenz einen blauvioletten Farbkomplex. Die Extinktion dieses Komplexes wird bei einer Wellenlänge von 546 nm in Küvetten von 20 mm Schichtdicke gemessen.

1. Lösungen

A. Biuretreagenz (nach WEICHSELBAUM)

Aus einer gesättigten Natronlauge wird zunächst eine 0,2 N Natronlauge hergestellt. In etwa 400 ml der 0,2 N Natronlauge werden 9,0 g Kaliumnatriumtartrat und danach 3,0 g feinst gepulvertes Kupfersulfat vollständig in Lösung gebracht. Erst dann setzt man 5,0 g Kaliumjodid zu und füllt mit 0,2 N Natronlauge auf 1000 ml auf.

Die Lösung ist in einer Kunststoff-Flasche, vor Licht geschützt, kühl aufzubewahren.

B. Natriumsulfat lösung, 27,2%ig

27,2 g Na_2SO_4 unter leichtem Erwärmen in Aqua bidest. lösen und nach dem Erkalten auf 100 ml auffüllen.

Die Lösung wird im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

C. Physiologische Kochsalzlösung, 0,9%ig:

9,0 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest.

2. Eichung des Biuret-Reagenzes

Der Faktor F des Biuretreagenzes soll zwischen 16,5 und 19,0 liegen.

Beispiel der Eichung:

Kontrollserum = 7,0 g Protein / 100 ml

Die Extinktion des Kontrollserums betrug $E = 0,393$

Der Faktor F des Biuretreagenzes $F = 7,0: 0,393 = 17,81$.

Es empfiehlt sich, den Faktor des Biuretreagenzes mindestens einmal wöchentlich zu kontrollieren.

3. Ansatz und Messung

Meßwert

1. 5,0 ml Lösung C
0,1 ml Bestimmungsmaterial
5,0 ml Lösung a
2. Leerwert
5,0 ml Lösung C
5,0 ml Lösung A

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte aus jeweils zwei Werten durch Messen bei 546 nm in 20 mm Küvetten gegen den Leerwert.

$x \text{ g Protein} / 100 \text{ ml Untersuchungsmaterial} = E \times F$
(E = Extinktion, F = Faktor des Biuretreagenzes)

Die Mitochondrienfraktion wurde auf eine Protein-Konzentration von ca. 5,0 mg in 0,2 ml des Mitochondriensedimentes eingestellt. Das Hirnhomogenat wurde ebenfalls auf eine Proteingesamtkonzentration von ca. 5,0 mg pro 0,2 ml des in Sucrose im Verhältnis 1:3 gelösten Homogenates eingestellt. Der erforderliche Ausgleich erfolgte mit Aqua bidest.

3. Beschreibung der Enzymbestimmungs- Methode

Die Bestimmung der Monoaminoxidase-Aktivität erfolgte nach der von N. POPOV und Mitarbeitern (1971) angegebenen Methode (31-34) wie folgt:

a) Prinzip:

Die bei der oxydativen Desaminierung durch Monoaminoxidase-Aktivität entstandenen Aldehyde wurden durch Zugabe von Semikarbazid zu Aldehydsemikarbazon fixiert. Das entstandene Aldehydsemikarbazon ist im UV-Bereich photometrisch sofort, aber auch noch nach mehreren Tagen meßbar (30).

b) Methodische Einzelheiten:

In drei 10 ml-Polypropylen-Zentrifugenbecher wurden je 0,2 ml des vorbereiteten Präparates (entweder Hirnhomogenat oder Mitochondriensedimente (verdünnt 1:3 mit 0,32 M Sucrose, ca. 5,0 mg Ges.-Prot.-Gehalt) pipettiert, 1,8 ml Natriumphosphatpuffer (180 mikro Mol, pH 7,4, +5°C) und 0,5 ml Semikarbazid (25 mikro Mol, pH 7,4, +5°C) zugegeben, suspendiert und 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert.

Durch Zugabe von 0,5 ml eines Amins wurde die Reaktion im Wasserbad bei 37°C gestartet.

0,5 ml Aminlösung enthielten:

- a. 15 mikro Mol Benzylaminhydrochlorid oder
- b. 9 mikro Mol Dopaminhydrochlorid oder
- c. 3 mikro Mol Tyramin oder
- d. 3 mikro Mol Serotoninkreatininsulfat.

Das Gesamtvolumen der Proben betrug 3,0 ml.

Der Leerwert wurde auf 2 Arten wie folgt hergestellt: Entweder wurde dem Leerwert das Amin erst am Inkubationsende hinzugegeben, oder der Leerwert wurde schon zu Inkubationsbeginn, unmittelbar vor der Aminzugabe, mit 1,0 ml 0,6-N Perchlorsäure enteiweißt.

Während der Inkubationszeit, die auf einen Zeitraum von

20 Minuten festgelegt wurde, wurden die Zentrifugenbecher im Rhythmus von 3 Minuten geschüttelt.

Die Reaktion der Meßproben wurde danach durch Zugabe von 1,0 ml 0,6-N-Perchlorsäure mit Hilfe einer quantitativen Proteinfällung beendet. Nach der Zentrifugation (10 Min. bei 3000 x g) wurde der Überstand, welcher in den Versuchsproben das Aldehydsemikarbazon enthielt, gegen den Blindwert in einem Spektralphotometer (P M Q II, Zeiss) im UV-Bereich (42) in Quarzküvetten bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen.

Der Aldehyd-Semikarbazon-Komplex .

- a. vom Benzylamin wurde bei 278 nm,
- b. vom Dopamin bei 238 nm,
- c. vom Tyramin bei 235 nm und
- d. vom Serotonin bei 242 nm gemessen.

Die Enzymbestimmung kann mit Hilfe der beschriebenen Methode innerhalb von 50-70 Minuten erfolgt sein!

4. Übersichtsdarstellung der Methode

I.	0,2 ml Enzympräparat 2-5°C
5 Minuten	1,8 ml Natriumphosphatpuffer
vorinkubieren	180 mikro Mol, pH 7,4, +5°C
bei 37°C	0,5 ml Semikarbazid
	25 mikro Mol, pH 7,4, +5°C

Verwendete Puffer und Chemikalien:

1. Natriumphosphatpuffer pH 7,4
Di-Natriumhydrogenphosphat
Ansatz 180 mikro Mol in 1,8 ml
17,700 g / 1000 ml Aqua bidest
Kaliumhydrogenphosphat
Ansatz 180 mikro Mol in 1,8 ml
13,690 g / 1000 ml Aqua bidest

Puffermischung nach SÖRENSEN:
pH 7,4 18,2 % Kaliumhydrogenphosphat
 81,8 % Natriumhydrogenphosphat
2. Sucrose-Lösung (Rohrzucker)
0,32 M 114,1 g ad 1000 ml Aqua dest
3. Perchlorsäure 0,6 N
Herstellung aus einer 60%igen PCA:
50,1 ml ad 500 ml Aqua bidest
4. Semikarbazidhydrochlorid (25 mikro Mol / 0,5 ml)
2,788 g ad 500 ml Aqua bidest
mit NaOH vorsichtig auf pH 7,4 einstellen:
(ca. 8 ml 1-N-Natronlauge ad 500 ml Semikarbazidhydrochlorid)
5. Dopamin (9 mikro Mol / 0,5 ml)
0,3546 g ad 100 ml Aqua bidest.
6. Tyramin (3 mikro Mol / 0,5 ml)
0,0823 g ad 100 ml Aqua bidest

7. Benzylamin (15 mikro Mol / 0,5 ml)
1,6 ml Lösung ad 500 ml Aqua bidest
8. Serotonin-Kreatininsulfat (5 HT -3 mikro Mol / 0,5 ml)
0,1215 g ad 50 ml Aqua bidest
9. Decarboxylase-Hemmer (Ro 4- 4602) Mg 293
(9 mikro Mol / 0,5 ml)
0,5274 g auf 100 ml Aqua bidest steril auffüllen.

III. 1. Teil der Untersuchungen über die MAO-Aktivität

Voruntersuchungen zur beschriebenen Enzymbestimmungsmethode

A. Arbeitsbedingungen

1. Die Tiere wurden stets um 8 Uhr getötet, um unbeeinflusst von einem möglichen Tagesrhythmus (1) der Ratte arbeiten zu können.
2. Konstanter Zeitraum und Temperaturkonstanz vom Transport bis zum Arbeitsbeginn mit dem Untersuchungsmaterial wurde beachtet.
3. Im Labor herrschte stets gleiche Raumtemperatur.
4. Es wurde stets mit den gleichen Enzympipetten gearbeitet, das Spülen der Glasgeräte erfolgte mit Prilzusatz (1 Eßlöffel auf ca. 3 l Wasser bei einer Temperatur von 30°C).

B. Vorversuche

1. Der Versuch, die Inkubation im Brutschrank ohne Luftumwälzanlage bei 37°C statt im Wasserbad bei gleicher Temperatur vorzunehmen, erwies sich als ausgesprochen ungünstig, da Luft- und Wasser-Wärmekapazitäten sich erheblich voneinander unterschieden (39).
2. Eine Mitochondrienfraktion wurde 24 Stunden bei 22°C aufbewahrt, gegenüber gleichaltrigem, kühl gelagertem Untersuchungsmaterial (0 - +4°C). Die bei Raumtemperatur gelagerten Mitochondrien zeigten keine Aktivität mehr,

während das kühl gelagerte Material noch eine unveränderte Enzymaktivität hatte.

3. Im sofort verarbeiteten Frischpräparat (Mitochondrien) wurde eine etwas höhere Enzymaktivität gegenüber kühl gelagertem Präparat des gleichen Tages, das aber 24 Stunden später verarbeitet wurde, festgestellt.
4. Der Überstand, in dem der Aldehyd-Semikarbazon-Komplex enthalten ist, wurde im Kühlschrank bei ca. $+5^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Absorption (34) des Aldehyd-Semikarbazon konnte auch noch nach mehreren Tagen im UV-Bereich mit unveränderter Extinktion gemessen werden.

C. Methodische Versuche und Resultate

Versuch Nr. 1

Vergleich der Leerwerte

1. Hirnhomogenat (5,0 mg Protein / 0,2 ml) wurde nach beschriebener Methode mit Dopamin oder Tyramin inkubiert, der Leerwert Nr.1 ohne Amin. Erst unmittelbar vor dem Inkubationsende wurde ihm das Amin zugesetzt und sofort mit 1,0 ml 0,6 N-Perchlorsäure die Reaktion in den Meßwerten und in dem Leerwert Nr.1 beendet. Bei Dopamin zeigte sich bei 238 nm eine Extinktion von 0,20, bei Tyramin $E = 0,38$, Wellenlänge 235 nm.
2. In diesem Versuch wurde ein zweiter Leerwert vor dem Aminzusatz vor Inkubationsbeginn mit 1,0 ml - 0,6 N Perchlorsäure enteiweißt, anschließend wurde er wie die Meßwerte (nach beschriebener Methode) weiterbehandelt.

Bei Dopamin $E = 0,20$, Wellenlänge 238 nm

Ergebnis:

Bei Tyramin $E = 0,38$, Wellenlänge 235 nm

3. Die Leerwerte wurden gegen den Natriumphosphatpuffer pH 7,4 (als Blindwert) gemessen.

Ergebnis: Die Blindwerte Nr.1 und Nr.2 für Dopamin waren gleich, desgleichen bei Tyramin für 1 und 2.

Eine weitere Bestätigung der Resultate ist möglich im direkten Extinktionsvergleich der Leerwerte.

4. Ein weiterer Leerwert wurde wie bei Nr.2 vor dem Inkubieren mit 1,0 ml Perchlorsäure enteiweißt, dann aber im Gegensatz zu 2 noch vor der Amingabe 10 Min. bei 3000 g zentrifugiert.

Ergebnis: bei Dopamin $E = 0,24$, Wellenlänge 238 nm

bei Tyramin $E = 0,30$, Wellenlänge 235 nm

Tab. 1: Bildung des Aldehyd-Semikarbazon-Komplexes bei:

	Leerwert Probe 1	Leerwert Probe 2	Leerwert Probe 3
1. Dopamin	$E = 0,20$	$E = 0,20$	$E = 0,24$
2. Tyramin	$E = 0,38$	$E = 0,38$	$E = 0,30$

Resultate: Die beiden von POPOV vorgeschlagenen Möglichkeiten, den Leerwert zu ermitteln, wurden bestätigt (siehe Tab.1 und Nr.3 des Versuches).

Bei der Zentrifugation einer Leerwertprobe (Nr.4) vor der Amingabe und vor dem Inkubationsbeginn entstanden abweichende Ergebnisse von 1. und 2.

Versuch Nr. 2

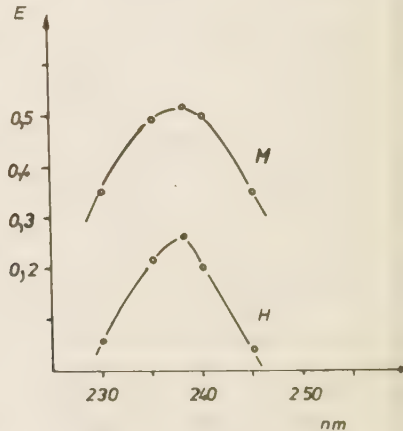
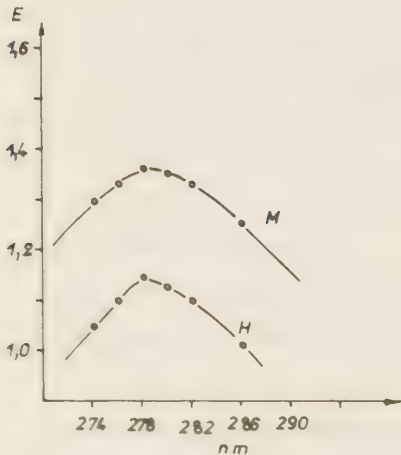
Aufzeichnung der Aldehyd-Semikarbazon-Spektren, gewonnen
von 4 verschiedenen Aminen. Als Enzympräparat diente
1. das Hirnhomogenat und 2. die Mitochondrienfraktion

Homogenat und Mitochondriensediment von einem Tag mit gleicher Proteinkonzentration von ca. 5,0 mg in 0,2 ml des Präparates wurden mit verschiedenen Aminen in angegebener Aminkonzentration nach beschriebener Methode behandelt.

Abb. 4: Aufzeichnung der Spektren des Aldehyd-Semikarbazonkomplexes vier verschiedener Amine im Homogenat und der Mitochondrienfraktion von Rattenhirnen.
(Aminkonzentrationen nach Literaturangaben)
H = Homogenat M = Mitochondrienfraktion
Angabe der Wellenlänge in nm

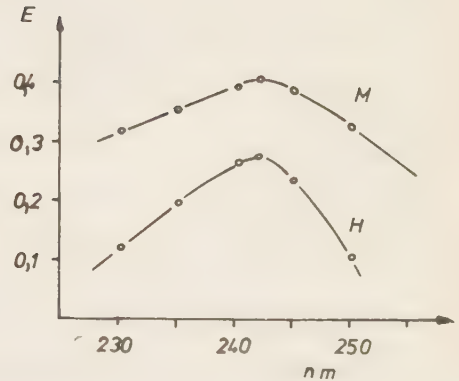
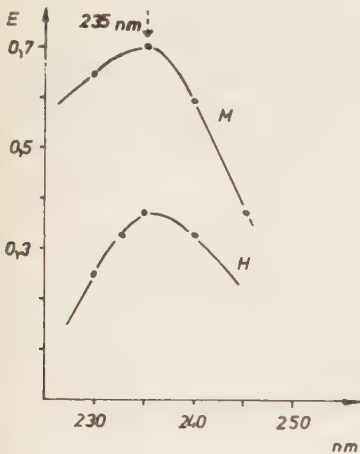
1. Benzylamin 15 mikro Mol

2. Dopamin 9 mikro Mol



3. Tyramin 3 mikro Mol

Serotonin (5HT) 3 mikro Mol



Resultate:

1. Die vier untersuchten Amine sind für Monoaminoxydase-Aktivitätsbestimmungen geeignet.
2. Jeder Aldehydsemikarbazonkomplex der untersuchten Amine hat bei einer ganz bestimmten Wellenlänge sein Extinktionsmaximum.
3. In der Mitochondrienfraktion wurde im Vergleich mit dem Homogenat bei Messungen mit allen vier Aminen eine höhere Enzymaktivität festgestellt.
4. Die Extinktion war bei den einzelnen Aminen unterschiedlich. Es wird also bestätigt, daß verschiedene Amine von gleichen Enzymmengen in verschiedener Weise inaktiviert werden (11).
5. Am stärksten katalysiert wird der Abbau von Tyramin und Benzylamin.

Tab. 2:

	Extinktion des Aldehyd-Semikarbazon von:			
	Benzylamin (15 μ Mol) <u>278 nm</u>	Dopamin (9 μ Mol) <u>238 nm</u>	Tyramin (3 μ Mol) <u>235 nm</u>	Serotonin (3 μ Mol) <u>242 nm</u>
Ext. bei Homogenat	1,15	0,27	0,37	0,28
Ext. bei Mitochondr.	1,36	0,51	0,71	0,41

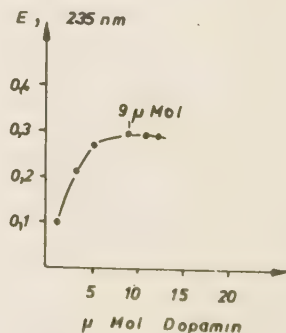
Versuch Nr. 3

Der Einfluß der Aminkonzentration auf die Extinktion des Aldehyd-Semikarbazon

In diesem Versuch wurde Rattenhirnhomogenat mit ca. 5,0 mg Protein / 0,2 ml als Enzympräparat verwendet. Nach beschriebener Methode wurde das Homogenat mit Dopamin als Substrat inkubiert. Das Dopamin hatte die verschiedenen Konzentrationen: 1, 3, 5, 9 oder 12 mikro Mol / 0,5 ml

Abb. 5:

Graphische Darstellung der Extinktion des Aldehyd-Semikarbazon bei den verschiedenen Aminkonzentrationen



Resultat:

Von 1 bis 9 mikro Mol / 0,5 ml Amin nahm die Extinktion des Aldehyd-Semikarbazon zu. Eine Aminzugabe von mehr als 9 mikro Mol verursachte keinen Anstieg der Extinktion.

Dieses Ergebnis bestätigt die Literaturangaben (POPOV 1971).

Versuch Nr. 4

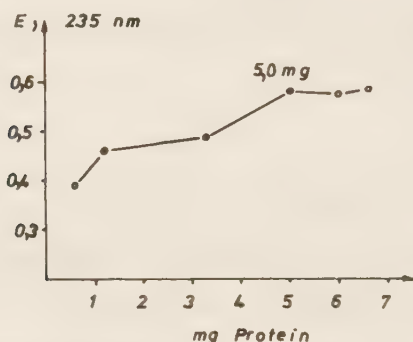
Der Einfluß der Proteinkonzentration auf die Monoamin-oxydase-Aktivität bei konstanter Aminzugabe von 3 mikro Mol Tyramin / 0,2 ml Mitochondriensediment

Die 24 Stunden lang kühl gelagerte Mitochondrienfraktion wurde nach der beschriebenen Enzymbestimmungsmethode mit konstant 3 mikro Mol Tyramin inkubiert und bei 235 nm gemessen. Das Homogenat wurde in verschiedenen Mengen (mg Protein / 0,2 ml Präparat) wie folgt verwendet:

Verdünnungsreihe:

- | | | | | |
|----|----------------|---|------------------------------|---|
| 1. | 0,6 mg Protein | / | 0,2 ml Mitochondriensediment | |
| 2. | 1,2 mg | " | / 0,2 ml | " |
| 3. | 3,3 mg | " | / 0,2 ml | " |
| 4. | 5,0 mg | " | / 0,2 ml | " |
| 5. | 6,0 mg | " | / 0,2 ml | " |
| 6. | 6,6 mg | " | / 0,2 ml | " |

Abb. 6: Darstellung der Extinktionen des Aldehyd-Semikarbazon-Komplexes bei verschiedener Mitochondrienprotein-Konzentration mit konstant 3 mikro Mol Tyramin



Resultat:

Von 0,6 bis 5,0 mg Protein / 0,2 ml Präparat ist ein Anstieg der Enzymaktivität festzustellen. Bei 6,0 mg und 6,6 mg pro 0,2 ml des Präparates nahm die Extinktion nicht mehr zu.

Damit steht fest, daß bei 5,0 mg Protein / 0,2 ml der Mitochondrienfraktion die höchste Extinktion mit 3 mikro Mol Tyramin als Substrat erreicht wird.

Versuch Nr. 5

Beispiel eines Versuches zur Hemmung der Monoaminoxidase-Aktivität in vitro (27) mit einem Decarboxylasehemmer

In diesem Versuch soll gezeigt werden, wie die Monoaminoxidase-Aktivität in vitro von dem Decarboxylase-Hemmer Ro-4-4602 verändert wird.

Die Angaben über sinnvolle Konzentrationen des Präparates

in dieser Versuchsreihe wurden von der Firma Hoffmann La Roche in Basel freundlicherweise zur Verfügung gestellt (5,6).

Methodische Veränderungen in diesem Versuch:

Das Inkubations-Totalvolumen von 3,0 ml wurde in etwas geänderter Form gegenüber der beschriebenen Methode wie folgt angesetzt:

0,2 ml Präparat (Mitochondrienfraktion,
5,0 mg Protein / 0,2 ml)

Statt 1,8 ml
nur 1,5 ml Natriumphosphatpuffer mit 180 mikro Mol
zusätzlich 0,3 ml Testsubstanz (Ro 4-4602)

3,0 ml = Totalvolumen

Die 0,3 ml Testsubstanz enthielten

entweder 10^{-2} Mol,
 10^{-3} Mol,
 10^{-4} Mol,
 10^{-5} Mol oder
 10^{-6} Mol -Ro 4-4602 (Hemmstoff).

Bei der Vorinkubation, die auf eine Gesamtzeit von 10 Minuten verlängert wurde, war in den Proben und im Leerwert die Testsubstanz Ro 4-4602 bereits enthalten. Eine Probe (Nr. 1) mit entsprechendem Leerwert wurde mit 0,3 ml Aqua dest. als Ersatzvolumen für die Testsubstanz zur Kontrolle herangezogen. Zusätzlich zu dieser Kontrolle wurde bei einer weiteren Probe (Nr.2) die Testsubstanz erst nach dem Inkubationsende unmittelbar vor der quantitativen Proteinfällung hinzugegeben.

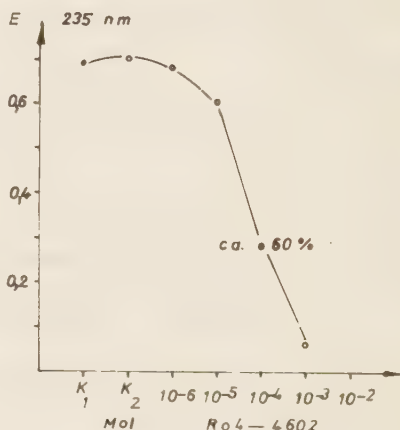
Das Tyramin (3 mikro Mol) diente als Substrat, die Extink-

tion wurde bei 235 nm gemessen.

Der Versuch wurde viermal wiederholt, jeder Meßwert wurde aus 2 Ansätzen ermittelt.

Abb. 7:

Extinktionswerte des Aldehyd-Semikarbazons bei 3 mikro Mol Tyramin mit dem Hemm-Zusatz Ro 4-4602 in den Konzentrationen: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} Mol:



Resultate:

1. Die Extinktion des Aldehyd-Semikarbazons wurde bei einer Konzentration von 10^{-4} M des Hemmstoffes Ro 4-4602 (6) um ca. 60 % (18) herabgesetzt.
2. Die Kontrollwerte Nr.1 und Nr.2 für die unbeeinflusste Aktivität zeigten gleiche Extinktionen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da das Gesamtvolumen der Leerwerte am Versuchsende mit den Proben identisch ist.
3. Eine Herabsetzung der Extinktionswerte des Aldehyd-Semikarbazons um 60 % kann nicht als eine Hemmung der Monoaminoxidase-Aktivität um den gleichen Betrag gedeutet werden, da die Extinktionsveränderungen nicht linear zu Veränderungen der Enzymaktivität verlaufen.

2. Teil der Untersuchungen der MAO-Aktivität:

Über die Wirkung von Steroidhormonen auf die Monoaminoxydase-Aktivität

1. Gewinnung der Schweinehirnmitochondrienfraktion

a) Das Schweinehirn

Zwei Großhirnhemisphären wurden dem gespaltenen Schädel des gerade getöteten Hausschweines^{*)} entnommen. Die Gefäße wurden weitgehend abpräpariert und das Hirn mit einer Schere grob zerkleinert. 80 g dieses Präparates wurden bei 0 - +4°C ca. 20 Minuten aufbewahrt.

b) Die Isolierung der Mitochondrienfraktion

Die Gewinnung der Mitochondrien erfolgte nach der Methode von KARLSON und Mitarbeitern (1964).

Ein Teil Hirngewebe und 3,5 Teile Sucrose-Trispuffer^{**)} wurden in einem Glas-Teflon-Homogenisator ca. zwei Minuten lang bei ca. 1000 rpm homogenisiert.

Das gewonnene Homogenat wurde bei 1200 x g 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Spritze und einer

*) Herrn Dr.med.vet. WAND, dem Direktor des hiesigen Schlachthofes wird auch an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Materials gedankt.

**) Zusammensetzung des Sucrose-Trispuffers:

85,5 g Rohrzucker/L=0,25 M + 18,64 g KCl/L=0,25 M +
20,331 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$ /L=0,10 M + 78,741 g Tris/L=0,65 M.
Die Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst und mit HCl auf einen pH von 7,5 eingestellt.

Der Überstand wurde jetzt 15 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert, der nun gewonnene Überstand wiederum abgesaugt und das Sediment erneut verworfen. Nach Zentrifugation des Überstandes bei 20 000 x g und 20 Minuten lag im Sediment die Mitochondrienfraktion vor. Das Sediment wurde in 0,25 M Sucrose resuspendiert und 3 Minuten im Glashomogenisator mit Teflonkolben homogenisiert, um aus der Mitochondrienfraktion den Sucrose-Trispuffer herauszuwaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (20 Min. bei 20 000 x g) liegt in diesem Sediment die gereinigte Mitochondrienfraktion vor. Das Sediment wurde gewogen und in 0,25 M Sucrose im Verhältnis 1:1,5 suspendiert.

1 Teil Gewebe und 3,5 Teile Trispuffer im Glas-Teflon-Homogenisator homogenisieren.

- 1.a.) Zentrifugation 1200 x g 7 Minuten
- b.) Überstand absaugen Sediment verwerfen
- 2.a.) Zentrifugation 2000 x g 15 Minuten
- b.) Überstand absaugen Sediment verwerfen
- 3.a.) Zentrifugation 20 000 x g 20 Minuten
- Sediment: Mitochondrien Überstand verwerfen
- b.) + 0,25 M Sucrose - resuspendieren

Zentrifugation 20 000 x g 20 Minuten

Im Sediment befinden sich die ausgewaschenen

Mitochondrien in Sucrose.

2. Untersuchungen über die Wirkung von Steroidhormonen
auf die Monoaminoxydase-Aktivität der Mitochondrien-
fraktion des Schweinehirns

Die Enzymbestimmung erfolgte nach der Methode von POPOV
und Mitarbeitern (1971).

Das Inkubations-Totalvolumen wurde wie folgt aufgestellt:

0,1 ml Mitochondriensediment (+ Hormonzusatz)

1,5 ml Natriumphosphatpuffer pH 7,8

0,4 ml Aqua bidest

0,5 ml Semikarbazid

0,5 ml Amin (Tyramin)

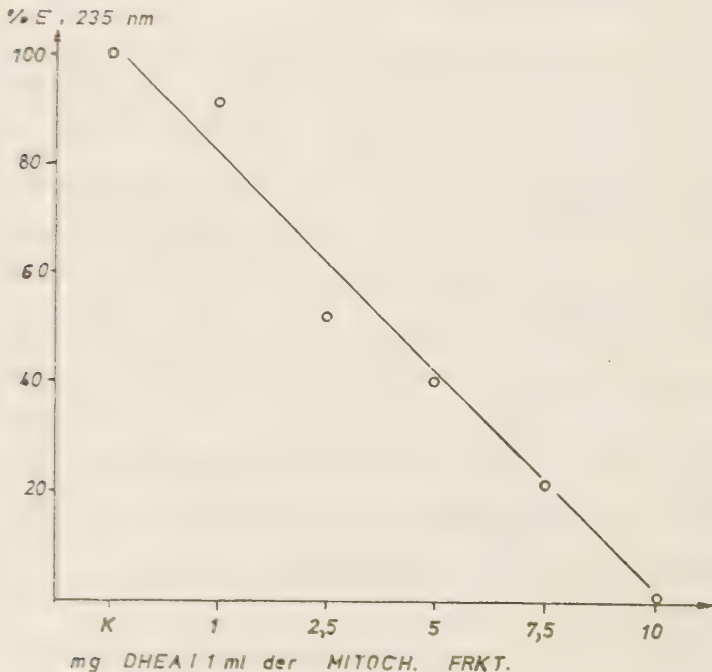
= 3,0 ml - Totalvolumen

Um die Wirkung von Steroidhormonen auf die Monoaminoxydase-Aktivität zu untersuchen, wurden je 1 ml der in Sucrose gelösten Mitochondrienfraktion eine bestimmte Menge von einem Hormon hinzugegeben und im Glashomogenisator 2 Minuten bei 500 rpm homogenisiert. Nach Beobachtungen von SCHNEIDER erwies sich diese Zerkleinerung der Hormonkristalle, wodurch eine Vergrößerung der Oberfläche erreicht werden soll, damit eine möglichst große Menge der Steroidsubstanzen in Lösung geht, als vorteilhaft. Diese Mitochondrien-Hormon-Suspension wurde 1 Std. bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert. Als Kontrollwert wurde 1 ml der Mitochondrienfraktion ohne Hormonzusatz ebenfalls inkubiert. Anschließend wurde je 0,1 ml des vorbereiteten Materials in 7 Einzelproben pipettiert. Durch den Substratzusatz von 0,5 ml Tyramin wurde die Reaktion im Wasserbad bei 37°C eingeleitet. - Nach 20 Minuten Inkubations-

zeit und der darauf folgenden quantitativen Proteinfällung mit 0,6 N-Perchlorsäure wurden die Proben 20 Minuten lang bei 100 000 x g zentrifugiert.

a) Untersuchungen über die Wirkung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf die MAO-Aktivität von Schweinehirn-mitochondrien:

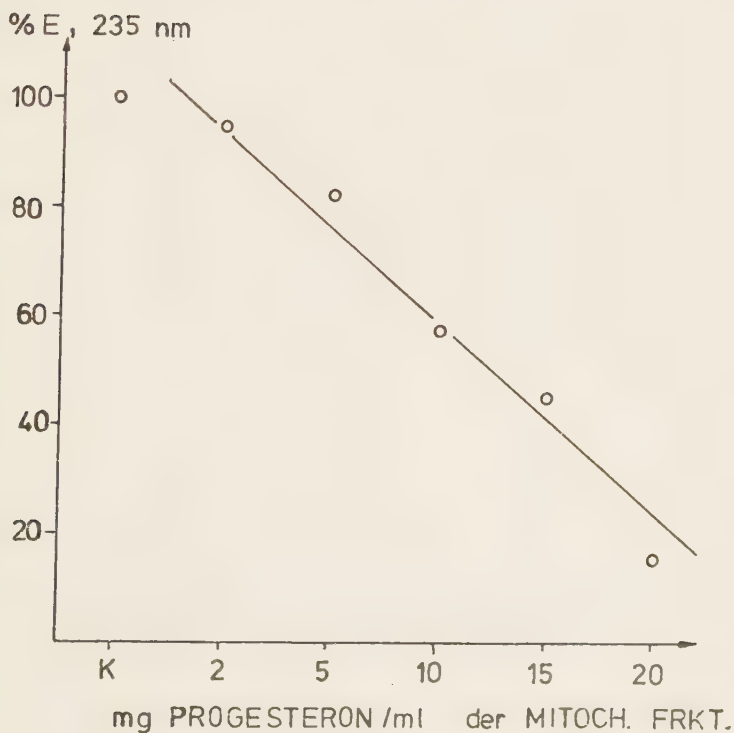
Abb. 5: Der Einfluß verschiedener Mengen DHEA auf die MAO-Aktivität von isolierten Schweinehirnmitochondrien. Die Werte sind Mittelwerte aus je 4 x 7 Einzelbestimmungen.
K=Kontrolle, E=Extinktion in % vom Kontrollwert(=100%)



b) Untersuchungen über die Wirkung von Progesteron auf die
MAO-Aktivität von Schweinehirnmitochondrien

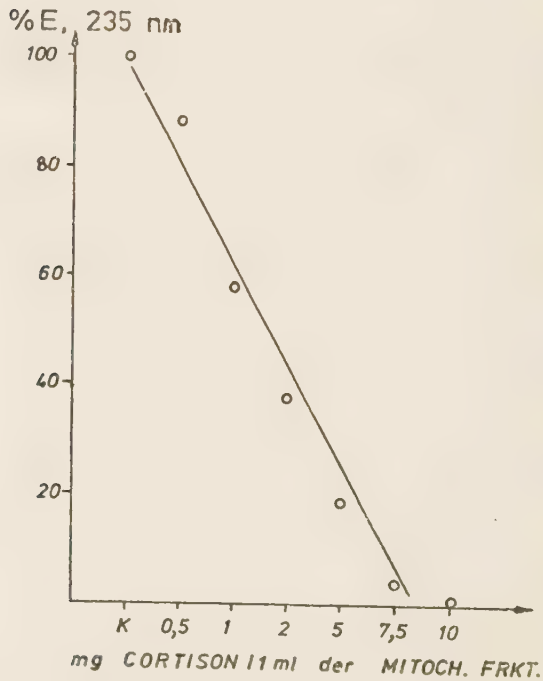
Abb. 9: Der Einfluß verschiedener Mengen Progesteron auf
die MAO-Aktivität von isolierten Schweinehirnmito-
chondrien. Die Werte sind Mittelwerte aus je 4 x 7
Einzelbestimmungen

K=Kontrolle, E=Extinktion in % vom Kontrollwert (=100%)



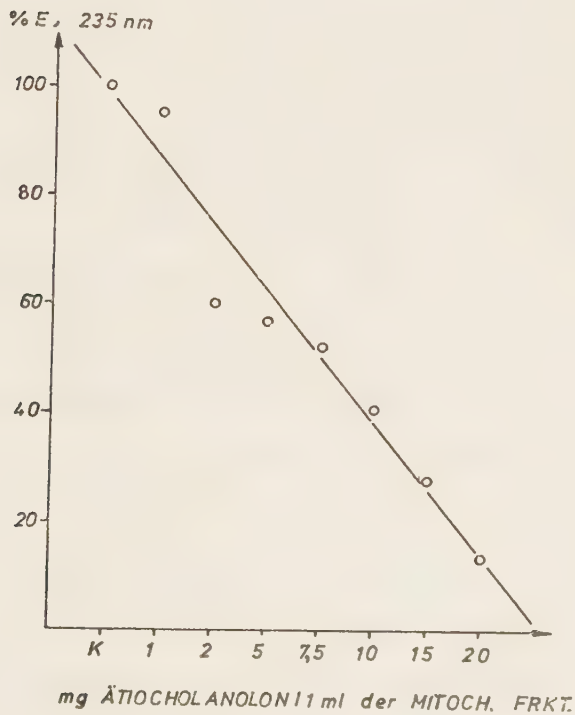
c) Untersuchungen über die Wirkung von Cortison auf die
MAO-Aktivität von Schweinehirnmitochondrien

Abb. 10: Der Einfluß verschiedener Mengen Cortison auf die
MAO-Aktivität von isolierten Schweinehirnmitochondrien. Die Werte sind Mittelwerte aus je 4 x 7
Einzelbestimmungen
K=Kontrolle, E=Extinktion in % vom Kontrollwert(=100%)



- d) Untersuchungen über die Wirkung von Ätiocholanolon auf die MAO-Aktivität von Schweinehirnmitochondrien

Abb. 11: Der Einfluß verschiedener Mengen Ätiocholanolon auf die MAO-Aktivität von isolierten Schweinehirnmitochondrien. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 x 7 Einzelbestimmungen
K=Kontrolle, E=Extinktion in % vom Kontrollwert(=100%)



Resultate:

1. Die Beobachtungen der Arbeitsgruppe SCHNEIDER über Monoaminoxidase-Aktivitätsänderungen bei Schweinehirnhomogenaten als Folge der Hormongabe in verschiedener Konzentration konnten auch mit der isolierten Mitochondrienfraktion bestätigt werden. In dieser Fraktion liegt das Enzym in einem wesentlich höheren Reinheitsgrad gegenüber dem Hirnhomogenat vor. Eine unerwünschte Verfälschung der Aktivitätsaufzeichnungen durch die Vielzahl der im Homogenat vorhandenen Artefakte wird hiermit weitgehend ausgeschlossen. In der Mitochondrienfraktion liegt gegenüber dem Homogenat eine erhebliche Anreicherung des Enzyms vor.
2. Die Hemmung der Enzymaktivität ist proportional der Menge des jeweilig zugefügten Steroidhormones.
3. Von allen vier untersuchten Hormonen (Ätiocholanolon, Cortison, Dehydroepiandrosteron und Progesteron) verursachte das Cortison die stärkste Hemmung der Enzymaktivität.
4. Die Hemmwirkung der Hormone auf die Monoaminoxidase ist in absteigender Reihenfolge:
 - 1) Cortison 7,5 mg / 1 ml der Mitochondrienfraktion = 100% Hemmung.
 - 2) Dehydroepiandrosteron 10 mg / 1 ml der Mitochondrienfraktion = 100%.
 - 3) Ätiocholanolon 15 mg / 1 ml der Mitochondrienfraktion = 80% Hemmung.
 - 4) Progesteron 15 mg / 1 ml der Mitochondrienfraktion = 55% Hemmung.

D I S K U S S I O N

Zunächst galt es, eine geeignete Methode zur Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung unter den vielen zur Auswahl stehenden bekannten Verfahren für unsere Zwecke herauszufinden.

Bei den manometrischen Methoden wird die bei der oxydativen Desaminierung erforderliche Sauerstoffmenge in einem in sich geschlossenen System (Warburg'scher Apparat) gemessen.

Außer dieser Sauerstoffverbrauchs-Bestimmung ist es möglich, die Menge des bei der Katalyse freiwerdenden NH_3 bzw. H_2O_2 zu ermitteln. Diese Methoden sind recht aufwendig und nicht frei von Fehlerquellen.

Bei weiteren Methoden wird der von der MAO-Aktivität abhängige Substratabbau bestimmt. Wir entschieden uns für die von POPOV und Mitarbeitern entwickelte Methode, bei welcher der durch Katalyse entstehende Aldehyd mit Semikarbazid eine chemische Bindung eingeht. Dieser Aldehyd-Semikarbazon-Komplex wird im UV-Bereich eines Photometers quantitativ bestimmt.

Bei der Durchführung der Versuche traten keine besonderen Schwierigkeiten auf. Wegen ihrer Einfachheit und wenig aufwendigen Versuchsanordnung erfordert die mit Hilfe dieser Methode durchgeführte Enzymbestimmung keine besondere Einübung bei den Messungen. Da Ergebnisse mit sehr geringen Gewebemengen bis herab auf 50 mg Frischgewicht gewonnen werden können, kann die Methode als sehr empfindlich bezeichnet werden.

Im 1. Teil der Arbeit galt es zunächst, nach erfolgter Reproduktion der Methode zu überprüfen, ob es sich bei den

Aktivitätsbestimmungen im Homogenat tatsächlich um die Wirkung der vorliegenden Monoaminoxydase handelt. Die im Homogenat vorliegende, unübersehbare Anzahl von Stoffen könnte dazu führen, daß irgendwelche Artefakte gemessen werden und für die Wirkung der Monoaminoxydase gehalten werden könnten. Aus diesem Grunde gingen wir auf die Mitochondrienfraktion über, bei der das Enzym gegenüber dem Homogenat in erheblich gereinigter Form vorliegt.

Der 2. Teil der Arbeit galt dem Studium der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Steroidhormonen und der Monoaminoxydase in vitro besteht. MARTA (1966), KAMBERI (1970) und ZOLOVICK (1966) haben im Gehirn der weiblichen Ratte rhythmische Veränderungen der Monoaminoxydase-Aktivitäten während des Oestrus-Zyklus festgestellt. Da während des Zyklus bekanntlich der Hormonspiegel periodischen Schwankungen unterliegt, kann an einen Zusammenhang zwischen der Höhe des Hormonspiegels und der Monoaminoxydase-Aktivität gedacht werden. Im Prooestrus (Vorbrunst) stellte KAMBERI eine Aktivitätserhöhung der Monoaminoxydase fest, während im Oestrus (eigentliche Brunst) und im Diestrus (Phase der relativen Sexualruhe) ein Abfallen der Monoaminoxydase zu verzeichnen war. Auch durch Kastration wird bei der Ratte die MAO-Aktivität beeinflusst (KLAIBER 1967; LEMAY 1967). Da durch die Kastration der normale Geschlechtshormonspiegel im Organismus beeinflusst wird, läßt sich auch hier ein Zusammenhang zwischen Geschlechtshormonspiegel und MAO-Aktivität vermuten.

In in-vitro-Versuchen an Schweinehirnhomogenaten wurde gezeigt (SCHNEIDER 1973, unveröffentlicht), daß ein direkter

Zusammenhang zwischen zugesetzter Steroidmenge und der Enzymaktivität besteht. Mit steigender Hormonmenge sinkt die Monoaminoxydase-Aktivität kontinuierlich stark ab.

Diese Verhältnisse sollten in vorliegender Arbeit an der Mitochondrienfraktion des Schweinehirns untersucht werden. Wie bereits erwähnt, liegt das Enzym bei der Mitochondrienfraktion in angereicherter und vor allem in gereinigter Form gegenüber dem Homogenat vor.

Bei Versuchen mit vier verschiedenen Steroidhormonen (Cortison, Dehydroepiandrosteron, Progesteron und Ätiocholanolon) ergab sich bei steigendem Hormonzusatz eine kontinuierlich steigende Hemmung der Monoaminoxydase. Die Wirkungsstärke der einzelnen Hormone war jedoch unterschiedlich. Die untersuchten Steroidhormone hemmen in absteigender Reihe die MAO wie folgt: 1. Cortison, 2. Dehydroepiandrosteron, 3. Ätiocholanolon, 4. Progesteron.

Dieser in-vitro-Versuch zeigt deutlich, daß es sich bei der Wirkung der Steroidhormone auf die Monoaminoxydase-Aktivität um eine direkte Wirkung handeln muß. Die Beurteilung der direkten Wirkung der Steroidhormone auf die Monoaminoxydase-Aktivität zu überprüfen ist vor allem im in-vitro-Versuch gegeben, da es sich bei der Hormongabe bei in-vivo-Versuchen durchaus um eine sekundäre Wirkung des Hormons auf die Enzymaktivität über mögliche Zwischensubstanzen handeln kann.

Corrigenda:

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die von POPOV und Mitarbeitern beschriebene Methode zur Monoaminoxidase-Aktivitätsbestimmung reproduziert, und eine Prüfung ihrer Verwendungsmöglichkeit für Enzymbestimmungen vorgenommen. An Rattenhirnhomogenaten und in Mitochondrienfraktionen von Ratten- und Schweinehirnen wurden Untersuchungen über die Wirkung von Steroidhormonen auf die Enzymaktivität durchgeführt.

Prinzip der MAO-Aktivitätsbestimmungsmethode: Die Bestimmung der Monoaminoxidase-Aktivität in Hirnhomogenaten und der Mitochondrienfraktion mit den Substraten Benzylamin, Dopamin, Tyramin und Serotonin beruht auf UV-Messung des Aldehyd-Semikarbazon, das sich aus dem Semikarbazid und den bei der oxydativen Desaminierung der Amine primär entstehenden Aldehyden bildet. Die Empfindlichkeit dieser photometrischen Methode erlaubt Aktivitätsmessungen in sehr kleinen Gewebemengen bis zu 50 mg Frischgewicht.

Resultate:

1. Die von POPOV u. Mitarbeitern (1971) entwickelte Methode konnte reproduziert werden.
2. Bei der Überprüfung der in der Literatur genannten verschiedenen Leerwertermittlungen konnten zwei Verfahren bestätigt werden.
3. Aktivitätsmessungen an Homogenaten und in der Mitochondrienfraktion zeigten - wie zu erwarten - unterschiedliche

Enzymaktivität, da in den Mitochondrien ca. 60 % der gesamten Enzymaktivität lokalisiert ist.

Diese Versuchsergebnisse sind ein zusätzlicher Hinweis dafür, daß es sich bei den Messungen tatsächlich um Monoaminoxydase-Aktivitätsbestimmungen handelt.

4. Alle 4 als Substrat verwendeten Amine waren für die Enzymbestimmung geeignet. Sie wurden von der Monoaminoxydase jedoch unterschiedlich katalysiert. Jeder Aldehyd-Semikarbazon-Komplex der verschiedenen Amine hat sein Extinktionsmaximum bei einer bestimmten Wellenlänge.
5. Eine Protein-Gesamtkonzentration des Präparates von mehr als 5,0 mg zeigte bei der gewählten Versuchsanordnung keine Aktivitätszunahme.
6. Am Beispiel eines in-vitro-Versuches konnte gezeigt werden, daß mit diesem Verfahren die Wirkung von Substanzen auf die Enzymaktivität geprüft werden kann.
7. In einem weiteren Versuch konnte die hemmende Wirkung von Steroidhormonen (Dehydroepiandrosteron, Progesteron, Cortison und Ätiocholanolon) - in vitro - auf die Monoaminoxydase-Aktivität bei Schweinehirnmitochondrien festgestellt werden. Diese Untersuchungen mit zum Teil wasserunlöslichen Hormonen basieren auf Anwendung der Erfahrungen von" SCHNEIDER (1973).

" Schneider, G.: Persönliche Mitteilung!

V. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. AKINDELE, M.O.
Monoamine oxidase; sleep and mood Electroencephalography
and Chemical Neurophysiology (Amsterdam).
Heft Nr. 1, 29, 47-56 (1970)
2. BENKERT, O.
Dissoziation zwischen Dopamin und Serotonin verstärkt ag-
gressives und sexuelles Verhalten.
Medical Tribune Kongressbericht 46(a) (1971)
3. BERGMAYER, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie GmbH Weinheim-Bergstr. (1967)
4. BRDICZKA, D. D.PETTE, G.BRUMER u. F.MILLER
Kompartimentierte Verteilung von Enzymen in Rattenleber-
mitochondrien.
Europ. J. Biochem. 5, 294-304 (1968)
5. BURKARD, W.P., K.F.GEY u. A.PLETSCHER
Inhibition of Decarboxylase of Aromatic Amino Acids by
2,3,4-Trihydroxybenzylhydrazine and its Derivate.
F.Hoffmann La Roche u.Co. Ltd. Basle, Switzerland
Received October, 8 (1963)
6. CALBIOCHEM!-Luzern
Dopa-Decarboxylase Inhibition.
Biologics from Calbiochem 63 (1971)
7. CHRISTEN, H.R.
Lehrbuch der Chemie.
Otto Salle Verlag, Ffm.-Hamburg (1968)
8. DEUTSCHE MEDIZINISCHE WOCHENZEITSCHRIFT
Die Lokalisation von biogenen Aminen im Z.N.
91, 318-320 (1966)

9. DETTRICH, R.A. u. V.G. ERWIN
A Convenient Spectrophotometric Assay for MAO
Analytical Biochemistry 30, 395-402 (1969)
10. DOCUMENTA GEIGY
Wissenschaftliche Tabellen
Geigy-Documenta 6 (1960)
11. GLICK, D.
Methods of Biochemical Analysis Volume 18 (1966)
Verlag John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto
12. GREEN, A.L. u. T.M. HAUGHTON
A Colorimetric Method for the Estimation of Monoamine-
Oxidase
Biochem. J. 78, 172 (1961)
13. GUHA, S.R. u. C.R. KRISHNA-MURTI
Purification and Solubilization of Monoamine Oxidase of
Rat Liver Mitochondria.
Biochemical & Biophysical Research Communications 8, 350-354
(1964)
14. HARMS, J.W. u. A. LIEBER
Grundbegriffe der modernen Zoologie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 2, (1970)
16 ff., 33-40, 249-252, 266, 316, 378
15. HAWKINS, J.
The Localisation of Amine Oxidase in the Liver Cell.
Department of Pharmacology, University of Oxford.
Biochem. J. 50, 577 (1952)
16. HOFFMANN, I. u. OSTENHOF
Enzymologie.
Springerverlag Wien (1954) 85, 113, 523 ff.
17. KAMBERI, A. YUTAKA u. KOBAYASHI
MAO-Activity in the Hypothalamus and Various Other Brain
Areas and in Some Endocrine Glands of the Rat During the
Estrus Cycle.
Journal of Neurochemistry 17, 261-268 (1970)

18. KARLSON, P.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie 2
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 57-95 (1967)
19. KARLSON, P. C.E.SEKERIS u. R.MAUERER
Zum Wirkungsmechanismus der Hormone, I
Verteilung von Tritium-markiertem Ecdyson in Larven von
Calliphora erythrocephala.
Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie 336,
100-106 (1964)
20. KIM, H.C. u. A.D.IRIO
Possible Isoenzymes of Monoamine-oxidase in Rat Tissues.
Canadian Journal of Biochemistry 4, 46 (1968)
21. KLAIBER, E.L., D.M.BROVERMANN u. Y.KOBAYASHI
The Automatization Cognitive Style, Androgens and Mono-
aminoxidase.
Psychopharmacologia (Berl.) 11, 320-336 (1967)
22. KUSCHINSKY, G. u. H.LÜLLMANN
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 2, 167 (1966)
23. LEMAY, A. et L.BERLINGUET
Influence de la castration et des hormones sexuelles sur
l'activité de la monoaminoxidase chez le rat.
Rev. Can. Biol. 26, 295-303 (1967)
24. LEUTHARDT, F.
Lehrbuch der Physiologischen Chemie.
Walter de Gruyter u.Co. Berlin 15, 388 (1963)
25. LOWRY, O.H., N.J.ROSEBROUGH u. A.L.FARR
Journal Biol. Chem. 193, 265 (1951)
26. BY MARTA, M.S., I.J.JOFRE u. J.A.IZQUIERDO
Monoaminoxidase and Catechol-O Methyltransferase Activity
in Cerebral Structures and Sexual Organs of Rats During
Their Sexual-Cycle.
Med. Pharmacol. Exp. 14, 8 ff (1966)

27. MATTHIES, H.W., CH. LIETZ, W. POHLE, N. POPOV u. K. GRADE
Vergleichende Untersuchungen über Monoaminoxydase-Hemmer
Acta biol. med. german. 17, 614 (1966)
28. MAURER, H.R.
Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Walter de Gruyter Verlag Berlin (1968)
29. LA MOTTE, R.H., D.E. SCHMIDT u. W.S. RULIFFSON
Multiple Substrate Determination of Monoamine Oxidase Distribution and Iproniazid Inhibition in Rat Brain.
Journal Neurochem. 16, 725 (1969)
30. PESTEMER, M. u. D. BRÜCK
Absorptions-Spektroskopie in: Methoden der organischen Chemie, Physikalische Methoden.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 3, 2, 673 (1950)
31. POPOV, N.
Habilitationsschrift
Medizinische Akademie Magdeburg (1968)
32. POPOV, N. u. W. FÖRSTER
Der Einfluß verschiedener Digitaliskörper auf die Monoaminoxydase im Gehirn.
Acta biol. med. german. 17, 221 (1966)
33. POPOV, N., W. LITZ u. H. MATTHIES
Wirkung von Monoaminoxydase-Hemmstoffen auf den Tryptamin-Gehalt des Rattenhirns und den "Tryptamin-Krampf".
Acta biolog. med. germ. 18, 233 (1967)
34. POPOV, N., V. RÖSLER, CHR. THIEMANN u. H. MATTHIES
Eine empfindliche Methode zur Bestimmung der Monoaminoxydase-Aktivität im Gewebe durch Aldehydsemikarbazon-Messung.
Acta biol. med. germ. 26, 239-245 (1971)
35. RAPOPORT, S.
Kurzgefaßtes Lehrbuch der Medizinischen Biochemie.
Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1-36 (1968)
471, 720, 719, 140-194

36. SCHMIDT, F.W.
Interpretation von Enzymbestimmungen.
Monatskurs für ärztliche Fortbildung 21-7, 268-269 (1971)
37. SHIH, J.H. u. S.EIDUSON
Multiple Forms of Monoamine-Oxidase in the Developing Brain.
Medical-Nature 27 (1969)
38. SMITHIES, O.
Zone Electrophoresis in Starch Gels Group Variation in the Serum Proteins of Normal Human Adults.
Biochem. Journal 61, 629 (1955)
39. STUART, H.A.
Kurzes Lehrbuch der Physik
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1966)
40. THIEL, A.
Mitochondrienschemata
D M W 84, 2038 (1959)
41. VOELKEL, A.
Klinische Erfahrungen mit einer Reihe von Monoamin-Freisetzern.
Psychiatr. et Neurol. Symposium Bad Nauheim 140, 1, 36-40 (1960)
42. WEISSBACH, H., T.E.SMITH, J.W.DALY, B.WITKOP u. S.UDENFRIEND
Rapid Spectrophotometric Assay of Monoaminoxidase.
National Institutes of Health, Bethesda-Maryland.
Biochem. J. 4, 235 (1960)
43. WESEMANN, W.
Isolation of 5-Hydroxytryptamin Containing Vesicles and of Synaptic Membranes from Rat Brain.
Febs Letters 3, 80 (1969)
44. YODIM, M.B.H., G.G.S.COLLINS u. M.SANDER
Multiple Forms of Rat Brain Monoamin-Oxidase
Nature 223 (1969)

45. YODIM, M.B.H., G.G.S. COLLIN u. M. SANDER
Isoenzymes of Soluble Mitochondrial Monoamine-Oxidase
Fabs. Symposium 18, 281-289 (1970)
46. ZOLOVICK, A.J., R. PEARSE, K.W. BOLHEKE u. B.E. ELFTHERIOU
Monoaminoxidase Activity in Various Parts of Brain
During the Estrous Cycle.
Science 154, 649 (1966)

Am Ende meiner Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. med.
H. Oepen für die Überlassung des Themas, sowie für das
ständige Interesse und seine unermüdliche Förderung bei
der Durchführung der Versuche.

Herrn Professor Wesemann danke ich für viele Ratschläge
und für die Bereitstellung von Arbeitsmaterial.

Herrn Dr. Schneider vielen Dank.

Herzlich danke ich Frau Grimm und den Damen des Labors
von Herrn Professor Wesemann für tatkräftige Hilfe.

L E B E N S L A U F

Am 2. Mai 1941 wurde ich als Zwillingsskind des Arztes Dr. med. Hans Schröder und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Karnatz, in Perleberg - Land Brandenburg geboren.

Von 1948 an besuchte ich die Knabenschule in Perleberg und anschließend die dortige Goethe-Oberschule, wo ich 1960 das Abitur ablegte. Nach der Flucht aus der sowjetischen Besatzungszone 1961 legte ich eine Abitur-Ergänzungsprüfung am Gymnasium in Delmenhorst ab. Vom Wintersemester 1962 bis zum Sommersemester 1964 studierte ich in Braunschweig Naturwissenschaften. Nach Erlangung eines Studienplatzes in Marburg im Wintersemester 1964/65 studierte ich Zahnmedizin und beendete das Studium 1971 mit dem Staatsexamen. Anschließend begann ich die Untersuchungen für die zahnmedizinische Dissertation im Institut für Humangenetik an der Universität Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Bommer, Bernhardt, Cleve, Deicher, Delbrück, Dimroth, Dölle, Gedigk, Golenhofen, Havemann, Hennis, Hensel, Hering, Hohorst, Heuser, Janke, Karlson, Klingenberg, Korb, Kühnel, Lehmann-Grube, Mahr, Mann, Martini, Niemeyer, Oepen, Pantke, Pelzl, Petry, Pfütz, Rodeck, Rohen, Rosemann, Salfeld, Schiff, Schleyer, Schmidt, Schneider, Seidel, Siegert, Strohmeyer, Walcher, Wiegandt, Wendt, Werner, Zilliken.

